



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01063505 A**(43) Date of publication of application: **09.03.89**

(51) Int. Cl

A61K 7/00(21) Application number: **63135392**(22) Date of filing: **01.06.88**(30) Priority: **26.06.87 DE 87 3721190**(71) Applicant: **HEYL CHEM PHARMAZEUT FAB
GMBH & CO KG**(72) Inventor: **BUNTE THOMAS
PARR WOLFGANG
HEYL EDUARD**(54) **COSMETIC**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a cosmetic containing a translation system consisting of a fraction of a dissolved material obtained from a cultured product of a yeast of the species *Saccharomyces cerevisiae* by mechanical treatment and effective for regenerating the skin and preventing the aging of the skin.

CONSTITUTION: This aging preventing cosmetic contains a translation system in a fraction of a dissolved material obtained from a cultured product of a yeast of the species *Saccharomyces cerevisiae* by

mechanical treatment. The translation system enables the synthesis of a protein characteristic to the living body and promotes the protein synthesis of skin cell. The fraction is preferably an eluate obtained by the gel-filtration of the dissolved material and the gel-filtration is preferably carried out by using a dextran having cross-linked network structure (Sephadex G-75). The skin protein biosynthesis action of the composition containing the fraction is inactivated by cycloheximide and, nevertheless, the composition enables the protein synthesis of the skin.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-63505

⑬ Int. Cl.⁴

A 61 K 7/00

識別記号

庁内整理番号

K-7306-4C

⑭ 公開 昭和64年(1989)3月9日

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全7頁)

⑮ 発明の名称 化粧品

⑯ 特 願 昭63-135392

⑰ 出 願 昭63(1988)6月1日

優先権主張 ⑱ 1987年6月26日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P 3721190.0

㉑ 発 明 者 トーマス、ブンテ ドイツ連邦共和国デー 1000 ベルリン62、グスタフミュ
ラーシュトラッセ 31

㉒ 出 願 人 ハイル、ヘミツシエー ドイツ連邦共和国デー 1000 ベルリン37、ゲルツアレー
ファルマツオイテイツ 253
シエ、フアブリク、ゲ
ーエムペーハー、ウン
ト、コンパニー、カー
ゲー

㉓ 代 理 人 弁理士 赤岡 迪夫
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

化粧品

2. 特許請求の範囲

- (1) サッカロミセス・セレビスエ種の酵母培養物から機械的操作によって得られた溶解物の一つの分画よりなる翻訳系を含む化粧品。
- (2) 分画が溶解物のゲル濾過の際に得られる溶出液であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の化粧品。
- (3) ゲル濾過が交叉網目構造デキストラン(セフデックスG-75)によって行われることを特徴とする特許請求の範囲第2項に記載の化粧品。
- (4) 分画が、30ミリモルトリス HCl pH 7.5 ; 200ミリモル KCl ; 5ミリモル $MgCl_2$; 6ミリモル 2-メルカプトエタノールおよび0.25ミリモル EDTA 中しょ糖 1.8モル ; 1モル ; 0.5モル および0.1モルよりなる不連続しょ糖濃度勾配によるゲル濾過の溶出液の分画によって得られる一

つの分画であることを特徴とする特許請求の範囲第2項または第3項の1項に記載の化粧品。

- (5) 分画が濃度勾配の1.8モル濃度段階に由来するものであることを特徴とする特許請求の範囲第4項に記載の化粧品。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、サッカロミセス・セレビスエ種の酵母培養物から機械的操作によって得られた溶解物の一つの分画よりなる翻訳系を含む化粧品ならびに皮膚処理のためのこの翻訳系の使用に関する。

皮膚が日常の仕事の遂行の際ならびに自然環境の作用によって、さらには自然条件によって制約される年齢変化によって老化してゆくことは公知である。それらの場合に皮膚は弾力性および柔軟性を失って弛緩する。生化学的に見るとこれは皮膚細胞の生命力喪失の結果である。これらの細胞はもはや細胞外母体成分を最適形態に合成する状態にはない。細胞外母体成分については蛋白が重要な意味を有するので、皮膚細胞の蛋白生合成系がもはや最適状態に機能していないということが

結論される。その結果として、一方では結合組織の新成分が十分に合成され得ず、またさらに他方では蛋白加水分解的に有効でありかつ老化した細胞外母体を再び分解しうる酵素も十分に生成されないことになる。このようにして皮膚の老化はまた自然の蛋白新陳代謝の支障という観点からも見ることができる。このような見方は多くの科学刊行物に立証されており、これらについては例えば下記のもの参照すればよい。

KANUNGO, M.S., D.KOUL and K.R.REDDY : Concomitant Studies on RNA and Protein Synthesis in Tissues of Rats of Various Ages. Exp. Geront. 第5巻、261頁、1970年。

KAO, K.Y.T. and T.H.McGAVACK : Connective tissue, XVIII. Age differences in procollagen hydroxylase of porcine uterine. proc. Soc. Biol. (N.Y.) 第130巻、491頁、1969年。

KAO, K.T., D.M.HILKER, T.H.Mc GAVACK : Connective tissue, III. Collagen and Hexo amine content of tissues of rats at different ages. proc. soc.

exp. Biol. 第104巻、359頁、1960年。

KAO, K.T., D.M.Hilker and T.H.McGAVACK : Connective tissue, IV. Synthesis and turnover of proteins in tissues of rats. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 第106巻、121頁、1961年。

KAO, K.Y.T., D.M.HILKER and t.h.McGAVACK : Connective tissue V. Comparison of Synthesis and turnover of collagen and elastin in tissues of rat of several ages. Proc. Soc. exper. Biol. (N.Y.) 第106巻、1961年。

本発明の課題は皮膚を再生しかつ皮膚の老化過程に対抗して作用する化粧品を提供することにある。

置くべきことには、特定酵母培養物から機械的操作により得られる溶解物の一つの分画中の、生体固有の蛋白合成を可能ならしめかつ皮膚細胞の蛋白合成を促進する翻訳系が得られることが見出された。その蛋白合成によって、既述のように、日常の仕事、環境の作用および自然老化過程によ

り支障を来たす細胞外母体代謝は、再度生理的に正しい程度の状態にもたらされ、従って皮膚は再生される。

この課題は、サッカロミセス・セレビスエ種の酵母培養物から機械的操作によって得られる溶解物の一つの分画を含む化粧品により解決される。

本発明の化粧品に含有される翻訳系を得るためには、まず第一にサッカロミセス・セレビスエの培養物を溶解する。この目的のためにはサッカロミセス・セレビスエの培養物、好適なものとしては振とう培養物を遠心分離し、生理食塩水で洗浄して再度遠心分離する。得られる沈澱物を4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンサルホン酸 (HEPES) を使用した HEPES / KOH-緩衝液中に中性 pH で懸濁する。この緩衝液は上記以外に酢酸マグネシウム、酢酸カリウムおよびしょ糖を含有する。引き続いて懸濁液を直径 0.05 mm のガラスビーズと 0℃ で振とうすることにより溶解する。酵母懸濁液 100 ml を完全溶解するには振とう時間約 10 分間が必要で

ある。酵母細胞の溶解にはまた、例えば T.G.Cooper, Biochimische Arbeitsmethoden, Walter de Gruyter, Berlin-New York 1981年、338頁～342頁に記載のような別の文献公知の方法を採用することもできる。

次いで溶解物を遠心分離して細胞核と破片とを目的に合うように除去する。

本発明の化粧品に使用される分画としては、溶解物のモレキュラーシーブによるクロマトグラフィー (ゲル濾過) で得られる溶出液を取るのが有利である。ゲル濾過にとりわけ好適なのは、例えばセファデックス G-75 のような交叉網目構造のデキストランである。

本発明の化粧品に使用するのにとりわけ好ましいのは、ゲル濾過-溶出溶液をさらに分離することにより得られる一つの分画である。この分離は不連続濃度勾配 (段階的濃度勾配)、好ましくはしょ糖濃度勾配を使用して行われる。この濃度勾配は次の段階すなわち、30ミリモルトリス HCl, pH 7.5 ; 200ミリモルト KCl ; 5ミリモルト MgCl₂ ;

6ミリモル2-メルカプトエタノールおよび0.25ミリモルEDTA中しょ糖1.8モル、1モル、0.5モルおよび0.1モルよりなるものであるのが好ましい。

この場合不連続濃度勾配をゲル濾過の溶出液により層別して100,000ないし150,000 G、好ましくは、130,000 Gで分離を行う。この操作は0ないし10℃、とりわけ好ましくは4℃の冷室温度で行うと有利である。分離の持続時間は濃度勾配の段階の取り方および遠心力の大きさによるが、一般的には10ないし30時間、より好ましくは15ないし20時間である。濃度勾配の個々の段階には溶出液の密度対応分画が存在する。次いで分画間はさらに濃度勾配の個々の段階の分離によって、より多くの層として得ることができる。

本発明の化粧品に应用するためには、濃度勾配の個々の段階に濃縮された一つの分画または複数分画を使用することができる。同様に濃度勾配の段階の一段階中に存在するのではなく、遠心分離ガラス管の底部に集積する最も重いポリリボソ-

ムもまた好適である。とりわけ好ましいのは上述のしょ糖濃度勾配の1.8モル段階に存在する分画である。

本発明において应用される分画は内生m-RNAを全く含有しないのが好ましい。もしも存在すれば、これは分画をマイクロコッカス・スクレアーズと共にインキュベートすることにより除去することができる。

本発明の化粧品に应用される分画は総リボソーム性蛋白生成系、ならびに、場合によっては、t-RNA、ATP、GTPおよび蛋白生成に通常利用されるアミノ酸を含有している。最後の成分すなわちアミノ酸は所望によっては添加することもできる。そのほかにもさらに、無機質、微量元素、ビタミンおよびその他の有効物質を添加することもできる。本発明による分画は、既述のように、リボソーム作用物質を含有し、外生m-RNAを読み取って翻訳する状態にある。その作用は、その分画が機能しうるリボソーム作用物質を提供し、障害を受けたリボソームを置き換える

ことよりなると解される。それによってアミノ酸の蛋白への翻訳のための十分なリボソームが再び生成し、従って障害を受けたかまたは老化した皮膚の蛋白生成が促進される。

本発明に好適なのは外生のm-RNAを読み取って蛋白に翻訳する状態にある分画である。それはそのほかにも密度勾配における沈降挙動によっても、さらには分画中の蛋白の共同作業によっても定義付けられる。これらの性質 B.Schulz Harder および E.R.Lochmann によって Zeitschrift für Naturforschung 第31巻、169-173頁、(1976年)に記載されているように決定される。

本発明に使用される分画はS-35メチオニンを蛋白中に組み込む能力によって標準化され、これは系を外的に添加されたm-RNA、S-35メチオニンおよびその他の非放射性アミノ酸を共にインキュベートすることによって行われる。続いてトリクロロ酢酸により蛋白を沈澱させた後、沈澱した蛋白中に存在する放射能をシンチレーシ-

ョン計数管中で定量する(B.Schulz-Harder および E.R.Lochmann の前出の文献参照)。

管内試験および生体内試験によって、本発明の化粧品を適用した場合には天然蛋白生成率が著しく上昇せしめられうることが示された。本発明による化粧品のこの刺激作用は下記試験により証明された。

1. 管内試験

a) チャイニーズ・ハムスターの卵巣細胞についての管内試験

b) ヒト繊維芽細胞についての管内試験

上記細胞の生成能力をシクロヘキシミドの添加により完全に遮断した。次いで細胞を二つの部分に分けた。その一方の部分の本発明において使用される分画および放射性アミノ酸S-35メチオニンと共にインキュベートした。他方の部分を同様にS-35メチオニンと共に、しかし上記分画を加えずにインキュベートした。

インキュベートの間、S-35メチオニンを蛋白中に組み込む蛋白生成が行われた。インキュ

ベート終了後、蛋白を酸で沈澱せしめ、沈澱した蛋白を放射性の存在について試験した。

その結果、本発明において使用される分画によって処理した沈澱は対照の沈澱に対して高い有意性で蛋白生成率を示した。

2. マウスにおける生体内試験

動物の背の毛をそった表皮部分に、皮膚の蛋白生成を抑制するために、まずシクロヘキシミドを皮内注射した。引き続いてマウスの一群に担体のみよりなる化粧品組成物をS-35メチオニンと共に塗布し、マウスの別の群に同じ化粧品組成物ではあるが本発明の分画15%を含む組成物をS-35メチオニンと共に塗布した。塗布量はいずれの場合も0.1gであった。

12時間インキュベート後、マウスをエーテルで屠殺し、皮膚表面部分を切除した。次いで表皮部分を抽出し、抽出液から酸により沈澱せしめ得た蛋白中の放射能を定量した。

その結果、本発明による分画を含む組成物は、皮膚蛋白生成をシクロヘキシミドによって不

活性化したにも拘わらず、皮膚の蛋白生成を可能にする、ということが示された。このことは本発明の化粧品が皮膚細胞の蛋白生成を高める状態にあることを意味する。

本発明の化粧品は局所投与される。その目的のためにはこの化粧品はクリーム、軟膏、ゲル、ローション、溶液のような常用の製剤として使用される。それらの製剤の中で本発明の化粧品は溶液として、または親液体としても製剤化することができる。これらの製剤はポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、カルボキシビニル重合体、パラフィン油、セチルステアリルアルコール、オレイン酸エステル、脂肪酸トリグリセライド、ポリアクリル酸エステル、グリセリン、アルコール等のような常用の担体系を基剤とする。上記製剤はまた保存剤、香油、緩衝液、湿潤剤等のような慣用の助剤を含有していることもできる。

以下実施例に従って本発明を説明する。

実施例1

下記成分を有する水/油-クリームの製造

a) セチルステアリルアルコール	9.0%
セチルステアリル硫酸ナトリウム	1.0%
オレイン酸デシルエステル	10.0%
羊毛脂	2.0%
分留やし油脂肪酸トリグリセリド	5.0%
保存剤	少量
b) 蒸留水	57.7%
ソルビットの70%溶液	5.0%
c) 蛋白生成有効物質系：ゲル濾過の溶出液	10.0%

化粧品の製剤化は次のようにして行う。すなわち、まず成分の組合せa)を溶融して約70℃に加温し、得られた溶融物を70℃に加温したb)に示す溶液に加える。全体を引続き攪拌し、クリームが約35℃に冷却するまで攪拌を続ける。次いで成分c)を混ぜ込み、均一に分散するまで攪拌する。

ゲル濾過の際に得られる溶出溶液の代わりに、不連続し、糖濃度勾配による溶出溶液の分離の際に得られる分画の一つを使用することもできる。

実施例2

下記成分を有する水/油-クリームの製造

a) 高分子エステル、好ましくはペンタエリスリット-脂肪酸エステルとクエン酸アルコールエステルとの混合エステルおよび鉱油性油脂	5.0%
オレイン酸デシルエステル	20.0%
植物油	5.0%
白色ワセリン	5.0%
保存剤	少量
b) 蒸留水	55.0%
c) 蛋白生成有効物質系：不連続し、糖濃度勾配の1.8モル段階で得られた分画	10.0%

化粧品の製剤化は実施例1に記載した方法により行われる。

実施例3

下記成分を有するゲルの製造

a) 蒸留水、保存剤処理	50%
カーボボール40 (ポリアクリル酸)	0.5%
フェノニップ(保存剤)	0.3%
b) 蒸留水、保存剤処理	28.2%

トリエタノールアミン 1.0%

c) 蛋白生成成有効物質系：不連続しょ糖
濃度勾配の1.8モル段階で得られた分画 20.0%

化粧品剤の製剤化は次のように行われる。成分組合せa)を迅速に攪拌して分散せしめ、次いでb)に掲げた溶液を加えて混合し、引続いて成分c)を加えて攪拌混合する。

実施例4

下記成分を有するローションの製造

a) 96容量%エタノール 15.0%
b) 蒸留水、保存剤処理 76.4%
クエン酸 0.3%
フェノニップ 0.3%
1,2-アプロピレングリコール 3.0%

c) 蛋白生成成有効物質系：不連続しょ糖
濃度勾配の1モル段階および0.5モル段階
で得られた分画 5.0%

化粧品剤の製剤化は下記のように行われる。b)に掲げた成分から溶液を製造し、次いでまずa)成分、次いでc)成分を加えて攪拌混合する。

実施例5

5ミリモル HgCl_2 ；6ミリモル2-メルカプトエタノールおよび0.25ミリモルEDTA中しょ糖1.8モル、1モル、0.5モルおよび0.1モルよりなる。沈澱物を振動バケット回転機中4℃、130,000Gで18時間遠心分離する。次いで濃度勾配を分画する。個々の分画を本発明の化粧品に使用することができる。

特許出願人 ハイル、ヘミッシェーファルマツォ
イティッシェ、ファブリク、ゲーエ
ムペーハー、ウント、コンパニー、
カーゲー

代理人 弁理士 赤岡 迪夫

本発明の分画の製造

サッカロミセス・セレビシエの振とう培養物を遠心分離して生理食塩水で洗浄し、改めて遠心分離して沈降物を30ミリモルトリスHCl, pH 7.5；200ミリモルKCl；5ミリモル HgCl_2 ；500ミリモルしょ糖；6ミリモル2-メルカプトエタノール；0.25ミリモルEDTAよりなる緩衝液に20%V：Vに再懸濁する。次いで再懸濁液を直径0.05mmのガラスビーズと0℃で振とうして溶解する。酵母懸濁液100mlを溶解するのに10分間の振とうが必要である。そのようにして得られた均質液を18,000gで10分間遠心分離して細胞核および細胞破片を除去する。精製した上澄液をセファデックスG75モレキュラーシーブカラムに加える。溶出液を集めて本発明の化粧品に使用することができる。

次いで溶出液全部を例えばBrij 58のような非イオン界面活性剤1%に調整し、引続いて不連続濃度勾配に層別する。この濃度勾配は、30ミリモルトリスHCl, pH 7.5；200ミリモルKCl；

第1頁の続き

- ⑦発明者 ウォルフガング、バー ドイツ連邦共和国デー 1000 ベルリン38、アイテルフリ
 ル ツツシュトラーセ 16
- ⑧発明者 エデウアルト、ハイル ドイツ連邦共和国デー 1000 ベルリン45、リマシュトラ
 ーセ 11

手続補正書

補正の内容

特許庁長官 殿

昭和63年6月28日

1. 事件の表示

昭和63年特許願第135392号

2. 発明の名称

化粧品

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ハイル、ヘミッシュェーファルマツォイテ
 イッシェ、ファブリク、ゲーエムベーハ
 ー、ウント、コンパニー、カーゲー

4. 代理人

住所 大阪市東区淡路町2丁目40番地4
 弘栄ビル 電話(06)222-0547

氏名 (6036) 弁理士 赤 岡 通

5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正による増加する請求項の数 1

7. 補正の対象

特許請求の範囲、発明の詳細な説明

8. 補正の内容

別紙のとおり

1. 特許請求の範囲を以下のように訂正する。

- (1) サッカロミセス・セレビシエ種の酵母培養物から機械的操作によって得られた溶解物の一つの分画よりなる翻訳系を含む化粧品。
- (2) 分画が溶解物のゲル濾過の際に得られる溶出液であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の化粧品。
- (3) ゲル濾過が交叉網目構造デキストラン〔セフデックスG-75〕によって行われることを特徴とする特許請求の範囲第2項に記載の化粧品。
- (4) 分画が、30ミリモルトリス HCl pH 7.5 ; 200ミリモル KCl ; 5ミリモル MgCl_2 ; 6ミリモル 2-メルカプトエタノールおよび0.25ミリモル EDTA 中しょ糖 1.8モル ; 1モル ; 0.5モル および0.1モルよりなる不連続しょ糖濃度勾配によるゲル濾過の溶出液の分画によって得られる一つの分画であることを特徴とする特許請求の範囲第2項または第3項の1項に記載の化粧品。

(5) 分画が濃度勾配の1.8モル濃度段階に由来するものであることを特徴とする特許請求の範囲第4項に記載の化粧品。

(6) 分画が凍結乾燥物の形であることを特徴とする特許請求の範囲第1項ないし第5項のいずれかに記載の化粧品。

2. 明細書第7頁第15行と第16行の間に下記を挿入する。

「分画はそのまま、標準化した溶液として、または凍結乾燥物として使用することができる。凍結乾燥は当業者に知られた慣用の方法によって実施し得る。」

3. 明細書第9頁第14行～第10頁第2行を以下のように訂正する。

「本発明に使用される分画はS-35メチオニンを含む蛋白中に取り入れる能力によって標準化される。これは以下のように行われる。

分画0.5mlへ外来mRNA1μg、S-メチオニン2mCおよびその他の非放射性アミノ酸を加える。この系を37℃でさらに30分間インキ

ュベートする。蛋白沈澱へ10%トリクロロ酢酸の3倍容積(1.5ml)を加え、4℃で10分間インキュベートする。蛋白を口取し、乾燥する。続いて沈澱した蛋白中に存在する放射能をシンチレーションカウンター中で定量する(8.Schulz-HarderおよびE.B.Lochmannの前出の文献参照)。

前記標準化法において、シンチレーションカウンターにより3000～5000カウント/分を与える分画が調製される。

この方法によって調製した分画は、3ないし40vol.%,好ましくは5ないし20vol.%の量で溶液として、または対応する量で凍結乾燥物として化粧品へ添加される。」

4. 同第12頁第18行と第19行の間に、「実施例中%は容積%である。」を挿入する。

5. 同第15頁最下行と第16頁第1行の間に下記を挿入する。

「下記成分を有する顔面マスクの製造

自己乳化性グリセリンモノステアレート	25g
コメデンプン	18g

カオリン 35g

杏仁粘土 10g

蛋白生合成有効成分系:

ゲル濾過溶出液、または不連続しょ糖勾配0.5, 1もしくは1.8モル段階で得られる分画30mlからの凍結乾燥物。

グリセリンモノステアートを粉砕し、そして他の成分と混合する。使用に際しては蒸留400mlとクリーム状にこね、体温で皮膚に塗る。

実施例1ないし5において、使用した分画は、上記標準化方法で4000カウント/分に相当する蛋白含量に調節した。また実施例1ないし4においてゲル濾過溶出液または分画の代わりに、それらの凍結乾燥物を使用することができる。

実施例6